

図 サイアザイド系利尿薬感受性遺伝子多型間での降圧度の差

TSC C1784T では CC 型の患者でサイアザイド系利尿薬投与により有意に降圧するが、T アレル保有者では有意な降圧が得られていない。

ADRB3 T727C では TT 保有者がサイアザイド系利尿薬に感受性をもつ。(文献 9) より引用)

ド受容体遺伝子 (*MLR*) などをダイレクト・シーケンスにより同定した一塩基多型 (SNPs), 合計 17 遺伝子, 48 多型をタイピングした。その結果, TSC C1784T と ADRB3 T727C (Trp64Arg) の 2SNPs が, 反応群・非反応群における頻度の差 (表) ならびに実際の降圧度 (図) において多型間に有意な差を認めた。しかしながら, 前述した *GNB3* C825T, *ADD1* Gly460Trp では有意な相関を認めなかった。これら *GNB3* や *ADD1* の多型は日本人高血圧への関与でも否定的な報告がされており, 人種差を反映している可能性がある。TSC 遺伝子多型のサイアザイド系利尿薬の効果への関与は, 同じ時期に大阪大学のグループからも報告されている¹⁰⁾。

III. 考 察

TSC は腎臓の遠位尿細管に存在し, サイアザイ

ド系もしくはサイアザイド類似利尿薬の薬理作用の標的である。サイアザイド系利尿薬は TSC による NaCl の再吸収を抑制し, ナトリウム利尿を生じる。TSC 機能の喪失により, Gitelman 症候群に認められるような低血圧, 低カリウム血症性アルカローシス, 低 Ca・Mg 血症が生じることはよく知られている。したがって, TSC 遺伝子の多型が血圧異常にかかわる可能性やサイアザイド系利尿薬の効果にかかわる可能性が考えられる。Melander らは南スウェーデンの地域住民 (約 600 名) を用いた検討で, TSC Arg904Gln が本態性高血圧に関与することを報告している¹¹⁾。われわれの日本人一般住民 (1,818 名) での検討では, Arg904Gln などのミスセンス変異とマイナー・アレル頻度が 5% 以上の SNPs 全 12 多型の高血圧への関与を検討したが, いずれも高血圧への有意な関連性を示さなかった¹²⁾。またサイアザイド系利尿薬の効果にかかわる TSC C1784T は, 女性で

高血圧に關与する傾向 ($p=0.153$) を示したものの有意ではなかった。TSC C1784T はイントロン 1 に存在するため、この多型そのもの、もしくはそれにリンクする多型が TSC の機能に影響を与えるかは現段階では不明である。

$\beta 3$ アドレナージック受容体 (ADRB3) は脂肪組織に多く分布し、その遺伝子多型 T727C (Trp64Arg) は肥満やインスリン抵抗性、糖尿病との関連性が報告されている。この多型の高血圧への関与は肯定・否定と報告が混在しているが、64Arg を有する人は体位変換時の交感神経活性の亢進が著明となることが報告されており¹³⁾、サイアザイド系利尿薬投与後に生じる反射性の交感神経亢進に影響し、その降圧効果を減弱させている可能性はある。

Pharmacogenomics 研究では再現性が重要となる。われわれは現在、全国の高血圧専門施設と共同で、降圧薬 (サイアザイド系利尿薬、アンジオテンシン受容体拮抗薬、カルシウム拮抗薬) 感受性遺伝子多型を同定するための前向き多施設臨床試験 (GEANE 研究) を進めている¹⁴⁾。後向き研究でサイアザイド系利尿薬の降圧効果に關与する可能性のある 2SNPs が、別の対象者でも同様な関連性を示すかどうかを確認することが重要と考えられる。

謝辞 本稿中の研究成果は、独立行政法人医薬品医療機器総合機構の「保健医療分野における基礎研究推進事業」より助成されたミレニアム・ゲノム・プロジェクト (高血圧等循環器疾患における遺伝子解析、創薬推進事業：研究代表者 国立循環器病センター病院長 友池仁暢) ならびに厚生労働省循環器病研究委託費 (16 公-1) によるものである。また GEANE 研究は平成 17 年度より厚生労働科学研究費 (萌芽の先端医療技術推進研究事業) のサポートを受けている。

文 献

1) Kamide K, Takiuchi S, Miyata T, et al : Single nucleotide polymorphisms analysis of hypertension relating to the effect of antihypertensive drugs-Millennium

Genome Project at NCVC. Jpn Heart J 45 (suppl) : S69-93, 2004

- 2) 神出 計, 河野雄平 : 高血圧の薬理遺伝学—ミレニアム・ゲノム・プロジェクト—, 血圧 12 : 855-860, 2005
- 3) Turner ST, Schwartz GL, Chapman AB, et al : C825T polymorphism of G protein beta (3) -subunit and antihypertensive response to a thiazide diuretic. Hypertension 37 (Part 2) : 739-743, 2001
- 4) Glorioso N, Manunta P, Filigheddu F, et al : The role of alpha-adducin polymorphism in blood pressure and sodium handling regulation may not be excluded by a negative association study. Hypertension 34 : 649-654, 1999
- 5) Schwartz GL, Turner ST, Chapman AB, et al : Interacting effects of gender and genotype on blood pressure response to hydrochlorothiazide. Kidney Int 62 : 1718-1723, 2002
- 6) Frazier L, Turner ST, Schwartz GL, et al : Multilocus effects of the renin-angiotensin-aldosterone system genes on blood pressure response to a thiazide diuretic. Pharmacogenomics J 4 : 17-23, 2004
- 7) Turner ST, Chapman AB, Schwartz GL, et al : Effect of endothelial nitric oxide synthase, alpha-adducin, and other candidate gene polymorphisms on blood pressure response to hydrochlorothiazide. Am J Hypertens 16 : 834-839, 2003
- 8) Sciarone MT, Stella P, Barlassina C, et al : ACE and alpha-adducin polymorphism as markers of individual response to diuretic therapy. Hypertension 41 : 398, 2003
- 9) Matayoshi T, Kamide K, Takiuchi S, et al : Thiazide-sensitive Na^+ - Cl^- cotransporter gene, C1784T, and adrenergic receptor- $\beta 3$ gene, T727C, may be gene polymorphisms susceptible to the antihypertensive effect of thiazide diuretics. Hypertens Res 27 : 821-833, 2004
- 10) Matsuo A, Katsuya T, Ishikawa K, et al : G2736A polymorphism of thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter gene predisposes to hypertension in young women. J Hypertens 22 : 2123-2127, 2004
- 11) Melander O, Ortho-Melander M, Bengtsson K, et al : Genetic variants of thiazide-sensitive NaCl-cotransporter in Gitelman's syndrome and primary hypertension. Hypertension 36 : 389-394, 2000
- 12) Kokubo Y, Kamide K, Inamoto N, et al : Identification of 108 SNPs in TSC, WNK1, and WNK4 and their association with hypertension in a Japanese general population. J Hum Genet 49 : 507-515, 2004
- 13) Shihara N, Yasuda K, Moritani T, et al : The association between Trp64Arg polymorphism of beta 3-adrenergic receptor and autonomic nervous system activity. J Clin Endocrinol Metab 84 : 1623-1627, 1999
- 14) 河野雄平 : 遺伝子多型検索による高血圧個別化医療の確立に関する研究. 厚生労働科学研究費補助金萌芽の先端医療技術推進研究事業 平成 17 年総括・分担研究報告書, 2006

将来のインターベンション対策

わが国における次世代医療機器開発の問題と対策

佐瀬一洋*

SASE Kazuhiro

*順天堂大学大学院医学研究科臨床薬理学

SUMMARY

わが国では、治療用医療機器の輸入超過傾向が続いており、国産の医療機器ですら欧米での開発が先行している。次世代医療機器の開発に対しては、「医療機器産業ビジョン」のなかで、研究、開発、生産、販売、使用のすべての段階について問題点を洗い出しつつ重点領域を前進させる体制が提唱されている。医療機器には多種多様の品目が含まれるが、基本的にはリスクに応じてクラス分類されており、治験の要否が判断されている。2005（平成17）年4月に改正薬事法が施行され、医療機器のクラス分類や承認審査体制、さらに医療機器の製造販売承認を取得するための基本要件も国際整合性が進みつつある。とくに、医療機器 GCP（Good Clinical Practice）により科学性、倫理性、信頼性という観点から国際的に通用しうる治験を実施する環境が整いつつあることから、医療機関における被験者保護とスピード、質、コストの改善が急務となっている。

POINTS

- 医療機器の製造と販売は薬事法により規制されている。
- 治験とは薬事承認を目的とした臨床試験のことである。
- GCP は臨床試験の科学性・倫理性・信頼性を担保する国際規範である。
- 開発の国際化が進むなかで臨床試験のスピード・質・コストの改善が急務である。
- 医療機関では被験者保護を念頭に試験の計画・実施を支援する体制を早急に整える必要がある。

KEY WORDS

医療機器、薬事法、健康保険法、GCP（Good Clinical Practice）、GHTF（Global Harmonization Task Force）

■ はじめに：医療機器の重要性と開発の現状

1) 疾病構造の変化と医療機器の重要性

高齢化社会を迎え、わが国においても心筋梗塞や脳卒中などのいわゆる生活習慣病が死因や要介護状態の原因の上位を占めるようになりつつある。

そのなかで、治療用の医療機器は、ステント、人工血管、植え込み型除細動器、そして補助人工心臓などに代表されるように、単にその規格や性能を示すのみならず、臨床試験の実施により虚血性心疾患、致死性不整脈、重症心不全に対する医療の質を改善しうることが示されてきた。

表① 医療機器のクラス分類

<ul style="list-style-type: none"> ・一般医療機器（クラスⅠ） 人の生命および健康に影響を与えるおそれがほとんどないもの [例] メス、ピンセットなど ・管理医療機器（クラスⅡ） 人の生命および健康に影響を与えるおそれがあるもの [例] MRI、電子式血圧計など ・高度管理医療機器（クラスⅢおよびクラスⅣ） 人の生命および健康に重大な影響を与えるおそれがあるもの [例] 透析器、ペースメーカーなど
--

(厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室，2005³¹⁾より一部改変引用)

表② 改正薬事法のポイント/医療機器

<ul style="list-style-type: none"> ・問題点 <ul style="list-style-type: none"> — 治療用医療機器などに対しては、医薬品と同様、保健衛生上の観点からの対策が必要。 — 一方、医療機器は、メス・ピンセットから画像診断装置、ペースメーカーに至るまで、技術・素材や使用形態・リスクにおいて、医薬品以上の多様性を有する。 ・改正のポイント① 医薬品と同様の対策 <ul style="list-style-type: none"> — 臨床試験をおこなうにあたってのルール。 (GLP、GCP、治験のための事前相談制度など) ・改正のポイント② 医療機器の特性を踏まえた対策 <ul style="list-style-type: none"> — リスクに応じた医療機器のクラス分類。 — 低リスクの医療機器にかかる第三者認証制度 など。 ・その他の主要な改正点 <ul style="list-style-type: none"> — 法制上の名称を「医療用具」から「医療機器」に変更。 — 製造（輸入）承認制度から製造販売承認制度に変更 など。

(厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室，2005³¹⁾より一部改変引用)

2) 医療機器の定義

医療機器とは、薬事法のなかで「人若しくは動物の疾病の診断、治療若しくは予防に使用されること又は人若しくは動物の身体の構造若しくは機能に影響を及ぼすことが目的とされている器具機械であって、政令で定めるもの（第2条第4項）」と定義されている¹⁾。

具体的には、メス、ピンセット、はさみから、歯科インプラントや人工関節などの医療材料、そしてMRIやPETなどの大型診断用機器など、幅広い範囲が医療機器のなかに含まれており、「適正に使用したにもかかわらず副作用または機能障害が生じた場合の人体に与えるリスク」に応じてクラス分類されている（表①）。

3) わが国における次世代医療機器開発の問題

世界的にみると、わが国における医療機器の国内生産

金額（1兆4,999億円）は大きいですが、輸入金額（8,836億円）が輸出金額（4,203億円）を大きく上回っている²⁾。

残念ながら、国際競争力を有する医療機器や医療材料が国内からは創出されにくく、国産にもかかわらず海外で開発されたり、また海外では標準的とされる医療機器の導入が遅れたりする事例もみられる。

■ 1. 医療機器と関連する法令

1) 薬事法と医療機器

薬事法は1943（昭和18）年に制定された。戦後不良粗悪なものが流通していたことから、1948（昭和23）年の旧薬事法制定により医療用具も法的規制の対象となった。現行薬事法は1961（昭和36）年に制定され、1994（平成6）年、2002（平成14）年7月の改正を経て現在に至っ

国際分類	リスクによる医療機器の分類	E U	F D A	改正前		改正薬事法			
				販売規制	販売業の届出不要	分類	リスク	販売規制	販売業の届出不要
クラスⅠ	不具合が生じた場合でも人体へのリスクがきわめて低いと考えられるもの(例)体外診断用機器、鋼製小物、X線フィルム、歯科技工用材料	承認不要	承認不要	販売規制	販売業の届出不要	一般医療機器	極低	販売規制	販売業の届出不要
クラスⅡ	不具合が生じた場合でも、人体へのリスクが比較的低いと考えられるもの(例)MRI、電子血圧計、電子内視鏡、消化器用カテーテル、超音波診断装置、歯科用合金	第三者認証	承認不要	販売規制	販売業の届出制	管理医療機器	低	販売規制	販売業の届出制
クラスⅢ	不具合が生じた場合、人体へのリスクが比較的高いとされるもの(例)透析器、人工骨、人工呼吸器、バルーンカテーテル	実地調査のみ	承認不要	販売規制	販売業の届出制	高度管理医療機器	中・高	販売規制	販売業の許可制の導入
クラスⅣ	患者への侵襲が高く、不具合が生じた場合、生命の危険に直結するおそれがあるもの(例)ペースメーカー、人工心臓弁、ステント	書面審査	承認不要	販売規制	販売業の届出制			販売規制	販売業の許可制の導入

図① 医療機器にかかる「カテゴリー」と「安全対策」の見直し
(厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室, 2005³¹⁾より一部改変引用)

ている。

改正薬事法の医療機器関連部分は、2005(平成17)年4月に施行された。法制上の名称が「医療用具」から「医療機器」に変更され、安全性対策の抜本的な見直しとして基本要件(essential principles)の定義³⁾、クラス分類の見直し⁴⁾、医療機器GCP(Good Clinical Practice)の整備⁵⁾⁻¹⁰⁾などが盛り込まれ、国際整合性が高められた(表②)。

基本要件とは、医療機器の製造販売承認を取得するために満たすことが必要な安全性・有効性に関する基本的な要求事項である。その内容は、医療機器の設計および製造に対する一般的な要求事項で、リスクマネジメントの徹底による可能な限りのリスク低減、意図する性能の担保、リスクベネフィットバランスの評価などが求められており、医療機器の臨床試験デザインについて検討する際には、常に基本要件を念頭に置かなければならない。

改正薬事法の施行に伴い、国際的な整合性も考慮して、従来の4分類から3分類型に変更された(図①)。

治験とは、薬事法上の製造販売承認申請(表③)に利用することを目的とした臨床試験のことである。治験の要否は、非臨床試験(動物実験やベンチテストなど)お

表③ 医療機器の承認申請に必要な資料概要の構成
(改正薬事法施行規則 第40条第1項第5号)

- イ 起源又は発見の経緯及び外国における使用状況等に関する資料
- ロ 仕様の設定に関する資料
- ハ 安定性及び耐久性に関する資料
- ニ 法第41条第3項に規定する基準への適合性に関する資料
- ホ 性能に関する資料
- ヘ リスク分析に関する資料
- ト 製造方法に関する資料
- チ 臨床試験の試験成績に関する資料

(厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室, 2005³¹⁾より一部改変引用)

よび海外あるいは類似医療機器の臨床データの利用可能性を考慮し、基本要件を満たすかどうかという観点から判断される。治験を実施する場合には、その科学性・倫理性・信頼性を担保するために医療機器GCP省令を遵守しなければならない。

非臨床試験(ベンチテストや動物実験など)においても、申請資料としての信頼性を担保するために必要とされる基準としてGLP(Good Laboratory Practice)が

法令として整備された。

このように、薬事法は主として輸入・製造・販売業者に対する規制と認識されているが、副作用の報告制度や被害救済制度、企業主導あるいは医師主導型治験制度への参加など、医療従事者および医療機関が担うべき役割が大きくなりつつある。

2) 健康保険法と特定療養費制度

国民皆保険制度を維持するわが国では、保険診療のなかで特殊療法は禁止されており、臨床試験の実施に関して問題になることがある。そのなかで、保険適用の前段階としての治験あるいは高度先進医療は、健康保険法にもとづく特定療養費制度として対応されている。

医療現場では、医薬品、医療機器に限らず、外科手術や放射線治療、リハビリなどを組み合わせて最善の医療を提供することが求められているが、適応外使用問題やいわゆる混合診療問題についても、薬事承認と保険適用の違いを認識しつつ、保険適用に必要なエビデンスづくりを含めて前向きに対処することが重要である。

今後、医療構造改革の流れを受けて、保険制度についてどのような方向性が示されるかが大きな関心事となっている。次世代医療機器の開発にあたっては、医療の質という観点から有効性や安全性を示すことはもちろん、医療経済学的な観点からその位置づけを明確にすることも必要となろう。

3) PL法とBAA法

PL法 (Product Liability Act: 製造物責任法) とは、製造物責任紛争において被害者の立証責任を緩和する法律である。製造者は、その製品を流通においた時点での科学技術水準からみて欠陥がないことに責任をもたなければならない。

現時点では、日本ではクラスアクションも懲罰的賠償金も認められておらず、医療機器に関するPL訴訟の数も少ない。また、わが国のPL法では免責事由として「部品製造業者の抗弁」と「開発危険の抗弁」の2項目が示されており、下請けの中小企業を保護し、企業の新製品の開発意欲に対する影響を小さくすることが期待されているという。

しかしながら、クラスアクションや懲罰的賠償金が認められている米国では、シリコン製品を使用した豊胸手術や下顎インプラントに関する訴訟など、医療機器に関する大規模な訴訟、とくに和解金を期待して大手企業を訴える事例が頻発し、大手材料供給業者が医療機器向けの提供を拒否するという「バイオマテリアル危機」が起こった。

BAA法 (Biomaterials Access Assurance Act, 1998) とは、材料供給業者を保護することによりバイオマテリアル危機を回避するために制定された連邦法であり、単なる原料供給だけをおこなう場合にはPL訴訟から免責となることを明記している。

次世代医療機器開発という観点からは、製品や材料を供給する業者の健全な育成を図る仕組みを整備して、本来の意味での消費者保護を実現することが重要となろう。

■ II. 医療機器規制の国際統合化

1) 日米欧における医療機器規制の現状

医療機器規制は、医薬品と比較した場合、各国間で制度の違いが大きい。米国は、市販前承認申請 (Pre-Market Approval: PMA) が中心で、食品医薬品局 (Food and Drug Administration: FDA) が審査している¹¹⁾¹²⁾。欧州では、CEマーキング制度が中心で、民間認証機関による認証の役割が大きい。現実的には、欧州でまず開発が進み、米国で承認されてから日本で小規模の治験を実施して承認申請をするというパターンが多い。

医療機器の臨床試験を実施する観点からは、日米では医薬品と同様にICH (International Conference on Harmonization: 日米EU医薬品規制調和国際会議) と同様のGCPをもつものの、EUではISO (International Organization for Standardization: 国際標準化機構) による「ヒト被験者を対象とした医療機器の臨床試験」(ISO 14155) を基本としている¹³⁾。

GCPに関連して、治験審査委員会の構成、緊急状況下における救命治験への対応、予測できない不具合の定義、有害事象の報告期日とその内容、治験の品質保証とモニタリング報告書、治験依頼者による監査の義務づけ、必須文書の種類と保存方法など、いくつかの点で国際的な

相違が指摘されている。

また、薬事法施行規則、IDE (Investigational Device Exemption)規則、EU 医療機器指令などの周辺規制にも若干の相違が指摘されている。治験機器概要書の定義と構成、治験医療機器の表示義務事項と表示禁止事項、総括報告書の書式、治験の要否判断 (同一性・類似性の解釈、有効性と性能、適合性基準の有無文献や非臨床データの活用、承認後の役割など)、利益相反問題、被験者への補償、原資料保護と個人情報保護など、国際共同試験の実施にあたって障害にならないように事前の調整が必要である。

2) ISO

ISOでは、2003 (平成15)年に医療機器の生物学的評価に関する技術委員会 (ISO/TC 194)により、「ヒトを対象とした医療機器の臨床試験」(ISO-14155 Part 1: 一般要件, ISO-14155 Part 2: 臨床試験実施計画書)をまとめた。そのなかで、GCPに相当する規定がISO-14155-1である。

すでにISO 14155は改正される方針が決まっており、適用範囲と用語定義、倫理およびインフォームド・コンセント、責任の所在と監査、治験の実施と有害事象の取り扱い、そして治験実施計画書の5部門に分かれて作業が進んでいる。

3) GHTF

医療機器規制の国際統合化会議 (GHTF: Global Harmonization Task Force)は、1992 (平成4)年、日本、アメリカ、ヨーロッパ、オーストラリア、カナダの規制当局を中心に創設された会議である。国際標準化機構 (ISO)、国際電気標準会議 (International Electrotechnical Commission: IEC)とも調整しながら、規制制度全般、不具合報告、医療機器・製造業者の製造管理および品質管理基準 (Good Manufacturing Practice: GMP) 運用指針、GMP 査察方法、臨床評価の定義などについてコンセンサスを積み重ねている。GHTFとISO/TC 194は重なり合う分野が多く、相互に歩調を合わせながら作業が進められている。

表④ 医療機関からみた旧医療用具 GCP と改正医療機器 GCP の主要な相違点

- | |
|----------------------------|
| 1. 治験総括医師制度の廃止。 |
| 2. 治験依頼者の責任とモニタリング・監査。 |
| 3. 有害事象報告。 |
| 4. 治験審査委員会 (外部委員の存在、審議資料)。 |
| 5. インフォームド・コンセント (文書による)。 |
| 6. 治験支援体制 (治験協力者など) の明確化。 |

(筆者作成)

4) PMDA

承認審査関連手続きについては、2004 (平成16)年4月に独立行政法人・医薬品医療機器総合機構 (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency: PMDA) が設立され、これまで医薬品医療機器審査センター、医療機器センター、医薬品機構に分かれていたものが統一された¹⁴⁾¹⁵⁾。

PMDAでは医用工学、生体工学、バイオマテリアルなどについて詳しい知識をもつ審査員を増員できるようになったため、幅広い専門性に対応できる審査体制を構築する準備を整えつつある。

今後、治験相談として治験開始前の段階で実施計画や申請に必要な資料について意見交換の場を設定することや、専門協議として審査の過程においても外部専門家との意見交換を通じ、より効率的・専門的な審査が期待されている。

■ III. 医療機器治験の実際

ヒトを対象とした臨床試験は、被験者保護の観点からヘルシンキ宣言に従わなければならない。2005年4月に改正医療機器 GCP が施行されたため、すでに医薬品の GCP に精通した治験コーディネーター (Clinical Research Coordinator: CRC) が、医療機器治験についてもほぼ同様に対応することが可能となった (表④)。医療機器治験と医薬品治験の相違点は、①治験実施体制 (薬事法関連)、②費用負担 (健康保険法関連)、③その他、に分類できる。

1) 治験実施体制 (薬事法関連)の問題

治験責任医師はその要件と責務が規定されているが、GCP 遵守および治験実施計画書を遵守し、科学性・倫理性・信頼性を担保することが求められている^{16)~23)}。

科学性については、従来の2施設60症例といった画一的な治験デザインが廃止された。さらに、治験総括医師が廃止され、治験実施計画書の作成などが治験依頼者の責務として明確化された。治験責任医師は、治験の目的、評価項目、症例数設定、有害事象発生時の対応などについて事前に十分に検討したうえで、治験実施計画書を遵守しなければならない。

倫理性については、世界的に被験者保護が重視される傾向にある^{24)~26)}。とくに、倫理審査委員会の形骸化防止、有害事象報告の徹底、インフォームド・コンセントの充実などが重要である。医療機器 GCP 施行により、文書による同意や治験審査委員会への外部委員の参加が必須となった。医療機器に特有の用語として「不具合」があるが、これは設計、製造販売、流通または使用の段階を問わず、破損、作動不良など広く具合の良くないことをいう。不具合報告に際しては、因果関係、重篤度、既知・未知の別、治験継続の可否について、治験責任医師の見解を明確にすることが重要である。

信頼性については、①モニタリングと監査、②治験医療機器の管理、③症例報告書の作成・提出、④記録の保存、⑤治験の契約様式、などが医薬品治験に準じて改訂された。医療機器 GCP 施行により、治験依頼者による直接閲覧が制度化され、症例報告書と原資料の整合性確保など、質の向上が期待されている。

2) 費用負担 (健康保険法関連)の問題

医療機器治験においては、医薬品と比較して治験にかかる費用負担の問題が明確化されるのが遅かった。治験中の費用負担については、まず医薬品治験について1996(平成8)年(保険発第22号)に特定療養費制度が適用されるようになったが、2002年3月18日、医療機器の治験についてもその対象となり(保医発第0318001号)、手術の前後1週間におこなわれた検査、画像診断、診療報酬上評価されない手術などについて治験依頼者による負担が明確化された²⁷⁾。

治験の費用を誰が負担するかについては、国際的にも種々の提言がなされている。米国ではIDE規則により有償治験を実施することが可能であるが、わが国においても、医師主導の治験などにかかる診療にあつては、検査、画像診断にかかる費用について、(手術・処置などの前後1週間におこなわれたものであるか否かにかかわらず)特定療養費の支給対象となるとともに、患者に当該治験対象である機械器具などの費用負担を求めることが可能となった。これは、いわゆる「混合診療」問題にかかる課題のひとつとして、2005年3月9日の中医協答申を受けた告示・通知の改訂^{28)~30)}となっている。

3) その他の問題

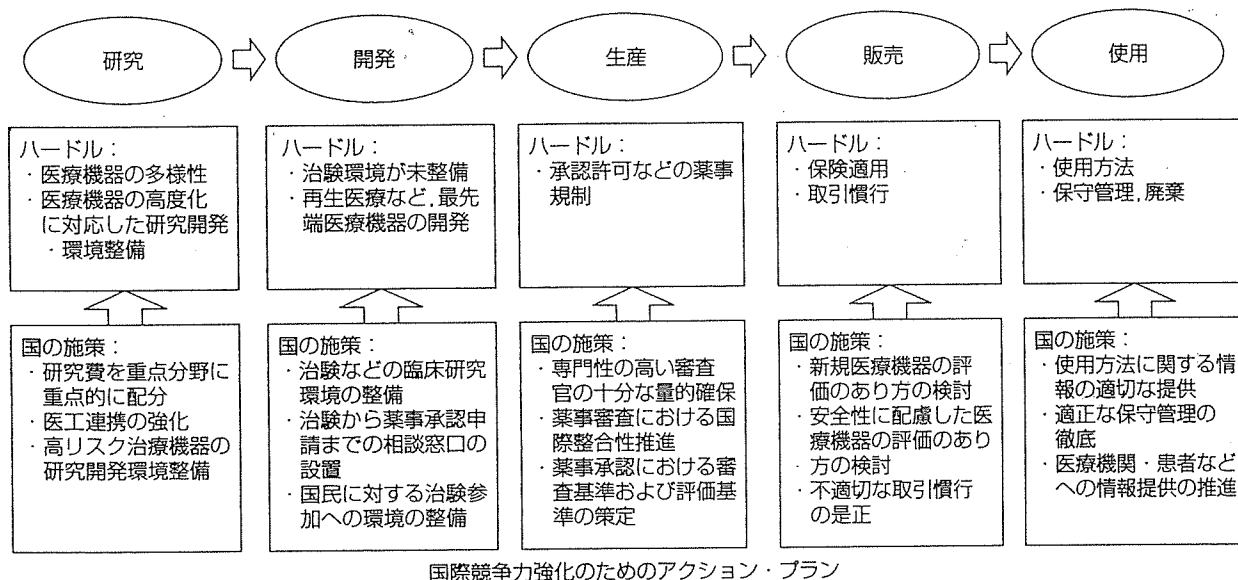
医療機器の治験には特有の問題が知られている。まず、手術手技を伴うため、施設・術者の違いによるバイアスや、ラーニング・カーブ(学習曲線)の影響を受けやすい。また、比較試験を実施する際、無作為化は可能でも盲検化が難しい。さらに、医薬品と異なり、植え込まれたまま治験実施期間を終了し、治験終了後も生命維持に直接関連するものも存在する。したがって、個々の医療機器の特性を考慮したうえで試験を計画・実施・解析することが重要である。

植え込み型の医療機器に対する特定医療用具としてのトラッキング制度は、承認前の治験には適用されない。しかしながら、治験期間終了後の安全性確保について、同様の注意が必要と思われる。

■ IV. 治験支援体制と CRC

医療機器の治験においても、医療機器 GCP の整備によって、ようやく CRC による支援の法的根拠が整った。「治験協力者」とは、治験責任医師または治験分担医師の指導のもとにこれらの者の治験にかかる業務に協力する薬剤師、看護師、臨床検査技師、臨床工学技士、その他の医療関係者のことである。

治験責任医師の責務は、治験実施計画書の検討にはじまり、同意説明文書の作成、分担医師・協力者リストの作成、被験者の選定、説明と同意、治験実施計画書の遵守、症例報告書の作成と提出、有害事象への適切な対応



図② 医療機器産業ビジョン（国際競争力強化のためのアクション・プラン）
 （厚生労働省，2005^{32）}より一部改変引用）

と報告など多岐にわたる。

今後、CRCに期待される役割は大きい。被験者保護を念頭に、質の高い治験を迅速かつ円滑に進めるため、GCPを理解し、治験責任医師を中心として良質のチームをまとめることが期待されている。

■ おわりに

情報やモノは容易に国境を越えるようになり、医療機器開発の国際化が進んでいる。医療機器産業ビジョン(図②)のなかでは、国が現状と課題についての分析をおこない、産業界とその認識を共有し、各企業に対して国際競争力強化のための行動を呼びかけ、アクションプランとして国としての支援策も提示している。

長く生きたい、良く生きたい。とくに、患者の声に一番近い医療機関においては、医療の質の向上を目的とした次世代医療機器開発のために、臨床研究を適切に計画・実施できるような体制整備と人材育成が求められている。



文 献

- 1) 薬事審査研究会監修：医療用具製造申請の手引き（第10版），薬事日報社，東京，2001
- 2) 厚生労働省 平成15年薬事工業生産動態統計年報の概要。http://www.mhlw.go.jp/topics/yakuji/2003/nenpo.html
- 3) 厚生労働大臣 薬事法第41条第三項の規定により厚生労働大臣が定める医療機器の基準（医療機器の基本要件）。平成17年3月29日，厚生労働省告示第122号
- 4) 厚生労働省医薬食品局長 薬事法第二条第五項から第七項までの規定により厚生労働大臣が指定する高度管理医療機器，管理医療機器及び一般医療機器の一部を改正する件（告示）及び薬事法第二条第八項の規定により厚生労働大臣が指定する特定保守管理医療機器の一部を改正する件（告示）の施行について 薬食発0311005号 平成17年3月11日，（局長通知）
- 5) 厚生労働省 医療機器の臨床試験の実施の基準に関する省令（医療機器GCP）。平成17年3月23日，厚生労働省令第36号
- 6) 佐瀬一洋：医師主導の治験及び臨床試験。Pharm Stage 3：42-51，2003
- 7) 佐瀬一洋：医師主導型治験を支える医療機関のサポート体制。月刊薬事 46：877-887，2004
- 8) 厚生労働省 医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令（新GCP）。平成9年厚生省令第28号
- 9) 厚生労働省 医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令の一部を改正する省令（改正GCP）。平成15年厚生労働省令第106号
- 10) 野口隆志編：改正GCPハンドブック，薬事日報社，東京，2005

- 11) CDRH, Food and Drug Administration (FDA). *Getting to Market with a Medical Device*, <http://www.fda.gov/cdrh/devadvice/3122.html>
- 12) American College of Cardiology, "Clinical Practice Guidelines Task Force 5: Assessment, Approval, and Regulation of New Technology" <http://www.acc.org/clinical/bethesda/beth28/9995/convrted/>
- 13) International Organization for Standards. *ISO 14155-2: 2003. Clinical investigation of medical devices for human subjects--Part 2: Clinical investigation plans*, 2003
- 14) 医薬品医療機器総合機構 <http://www.pmda.go.jp/>
- 15) 佐瀬一洋: 独立行政法人医薬品医療機器総合機構. *Cancer Frontier* 5: 126-130, 2003
- 16) Stalk NJ: 医療用具の臨床試験—その実践的ガイダンス, 中村晃忠編, サイエンティスト社, 東京, 2004
- 17) Pieterse H *et al*: *International Medical Device Clinical Investigation. A Practical Approach, 2nd ed.*, Interpharm Press, Illinois, 1999
- 18) Global Harmonization Task Force. <http://www.ghtf.org/>
- 19) 厚生省薬務局長. 医療用具の臨床試験の実施に関する基準について(旧・医療用具 GCP). 平成4年薬発第615号(局長通知)
- 20) 医療機器センター編: 医療用具 GCP ハンドブック (改訂版), 薬事日報社, 東京, 2001
- 21) 厚生労働省医薬食品局長. 医療機器の臨床試験の実施の基準に関する省令の施行について. 平成17年7月20日. 薬食発第0720003号(局長通知)
- 22) 厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室. 医療機器の臨床試験の実施の基準に係る必須文書について. 平成17年7月20日(事務連絡)
- 23) Gallin JJ: NIH 臨床研究の基本と実際, 井村裕夫監修, 丸善株式会社, 東京, 2004
- 24) Institute of Medicine of the National Academies. *Responsible Research—A Systems Approach to Protecting Research Participants*. National Academy Press, Washington DC, 2003
- 25) Steingrook R: *Improving Protection for Research Subjects*, *N Engl J Med* 346: 1425-1430, 2002
- 26) Amdur RF: IRB ハンドブック, 栗原千恵子, 斉尾武郎訳, 中山書店, 東京, 2003
- 27) 厚生労働省保険局医療課長, 保険局歯科医療管理官. 療担規則及び薬担規則並びに療担基準に基づき厚生労働大臣が定める揭示事項等」及び「選定療養及び特定療養費に係る厚生労働大臣が定める医薬品等」の制定に伴う実施上の留意事項について. 平成14年3月18日 保医発第0318001号(課長通知)
- 28) 厚生労働大臣. 健康保険法第八十六条第一項に規定する療養についての費用の額の算定方法の一部を改正する件. 平成17年3月23日. 厚生労働省告示第102号
- 29) 厚生労働省保険局医療課長. 療担規則および薬担規則ならびに療担基準に基づき厚生労働大臣が定める揭示事項等」および「選定療養および特定療養費に係る厚生労働大臣が定める医薬品等」の制定に伴う実施上の留意事項について」の一部改正について. 平成17年3月31日. 保医発第0331011号(課長通知)
- 30) 厚生労働省保険局医療課長. 診療報酬請求書等の記載要領等について」の一部改正について. 平成17年3月31日. 保医発第03310006号(課長通知)
- 31) 厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室. 「改正薬事法のポイント～承認・認証制度及び販売規制」(http://www.pmda.go.jp/pdf/yakujihou_point2.pdf, accessed November 30, 2005)
- 32) 厚生労働省. 「医療機器産業ビジョン～“より優れた”“より安全な”革新的医療機器の提供を目指して～」平成15年3月31日. (<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2003/03/s0331-5.html>, accessed November 30, 2005)

SASE Kazuhiro

順天堂大学大学院医学研究科
臨床薬理学教授

させ・かずひろ

1961年, 東京都生まれ.

1986年, 京都大学医学部卒業.

北野病院にて内科・麻酔科研究.

1989年, 京都大学大学院医学研究科

入学(内科系専攻).

1994年, 米国ハーバード大学ブリガム

& ウィメンズ病院留学(分子心臓

病学).

1997年, 帰国.

親友会島原病院循環器内科医長.

1998年, 国立循環器病センター緊急部, 治験管理室長, 臨

床試験開発室長.

(1999～2000年, 医薬品医療機器審査センター出向.)

2005年9月より現職.

専門: 循環器内科学, 分子心臓病学.

研究テーマ: 虚血性心疾患, 血管生物学, 分子イメージン

グ, 臨床疫学, 国際共同治験.

趣味: マラソン, 水泳, 旅行.

愛読書: 「第三の波」アルビン・トフラー(1980), 「利己的

な遺伝子」リチャード・ドーキンス(1991), 「ザ・サーチ

グーグルが世界を変えた」ジョン・バッテル(2005)

E-mail: sase@skyblue.ocn.ne.jp



B-Type Natriuretic Peptide Strongly Reflects Diastolic Wall Stress in Patients With Chronic Heart Failure

Comparison Between Systolic and Diastolic Heart Failure

Yoshitaka Iwanaga, MD,* Isao Nishi, MD,* Shinichi Furuichi, MD,* Teruo Noguchi, MD,* Kazuhiro Sase, MD,* Yasuki Kihara, MD, FACC,† Yoichi Goto, MD,* Hiroshi Nonogi, MD*

Suita and Kobe, Japan

OBJECTIVES	We explored the stimulus for B-type natriuretic peptide (BNP) secretion in the clinical setting of heart failure (HF).
BACKGROUND	Increasingly, plasma BNP levels are being incorporated into the clinical assessment and management of systolic heart failure (SHF) as well as diastolic heart failure (DHF). However, heterogeneity in BNP levels among individuals with HF can cause some confusion in interpreting results.
METHODS	In 160 consecutive patients presenting with HF, we measured plasma BNP levels and performed echocardiography and cardiac catheterization. Systolic and diastolic meridional wall stress was calculated from echocardiographic and hemodynamic data.
RESULTS	Although plasma BNP had a significant correlation ($r^2 = 0.296$ [$p < 0.001$]) with left ventricular end-diastolic pressure (EDP) as previously reported, the correlation between plasma BNP and end-diastolic wall stress (EDWS) ($r^2 = 0.887$ [$p < 0.001$]) was more robust. In a subanalysis of 62 patients with DHF, a similar result was obtained ($r^2 = 0.143$ for EDP and $r^2 = 0.704$ for EDWS). In a comparison between SHF and DHF, the BNP level was significantly higher in SHF ($p < 0.001$). Although EDP did not show any difference, EDWS was significantly higher in SHF than in DHF ($p < 0.001$).
CONCLUSIONS	The present study shows that plasma BNP levels reflect left ventricular EDWS more than any other parameter previously reported, not only in patients with SHF, but also in patients with DHF. The relationship of left ventricular EDWS to plasma BNP may provide a better fundamental understanding of the interindividual heterogeneity in BNP levels and their clinical utility in the diagnosis and management of HF. (J Am Coll Cardiol 2006;47:742–8) © 2006 by the American College of Cardiology Foundation

Plasma B-type natriuretic peptide (BNP) levels are reported not only to be a strong marker of left ventricular (LV) dysfunction, but also a marker to predict morbidity and mortality accurately in patients with chronic heart failure (HF) (1,2). Recently, BNP-guided therapy for chronic HF

See page 749

has been suggested. Troughton et al. (3) demonstrated that pharmacotherapy guided by BNP levels reduces cardiovascular events and delays time to first cardiovascular event compared with intensive clinically guided therapy. Recent reports also demonstrated the contribution of LV diastolic function to plasma BNP levels and the usefulness of BNP in the diagnosis of diastolic HF (4).

However, heterogeneity in BNP levels among individuals with HF has been recognized, and it has caused some confusion in interpreting results (5). Previous human studies have suggested correlations between BNP levels and cardiac functional or dimensional indexes such as end-diastolic pressure (EDP), ejection fraction (EF), pulmonary capillary wedge pressure, and LV volume, none of which sufficiently explain the heterogeneity (6–9). Therefore, it is essential to determine the stimulus for BNP secretion in the clinical setting of HF. In vitro studies have clarified the mechanism of secretion and regulation of BNP precisely (10). Stretch of cardiomyocytes is reported to be the most important stimulus of BNP regulation (11). It is also believed that BNP in humans may be released from the heart in response to increased wall stress. However, there have been few human studies exploring a direct relationship between wall stress and BNP regulation (12). Vanderheyden et al. (13) have very recently demonstrated, for the first time, in 40 patients with aortic stenosis (AS), a significant correlation of BNP with LV end-diastolic wall stress (EDWS). In their study, however, subjects were limited to patients with AS. Hence, there now is a need for the same assessment in patients

From the *Division of Cardiology, National Cardiovascular Center, Suita, Japan; and the †Department of Cardiovascular Medicine, Kobe City General Hospital, Kobe, Japan. Dr. Iwanaga is presently affiliated with the Department of Cardiovascular Medicine, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan. This study was supported by a research grant from Osaka Heart Club (Japan) and a grant for Clinical Vascular Function from Kimura-Kinenn Foundation (Japan).

Manuscript received January 25, 2005; revised manuscript received July 13, 2005, accepted August 22, 2005.

Abbreviations and Acronyms

AS	= aortic stenosis
BNP	= B-type natriuretic peptide
CHF	= congestive heart failure
DHF	= diastolic heart failure
EDP	= end-diastolic pressure
EDWS	= end-diastolic wall stress
EF	= ejection fraction
HF	= heart failure
LV	= left ventricle/ventricular
LVEDVI	= left ventricular end-diastolic volume index
LVMI	= left ventricular mass index
SHF	= systolic heart failure
SWS	= systolic wall stress

with HF of various etiologies. Accordingly, in the present study, we evaluated plasma BNP levels in 160 consecutive patients presenting with HF of various etiologies including diastolic HF.

METHODS

Patients. Among the patients referred to our National Cardiovascular Center Hospital between October 2003 and December 2004, we included in this study those admitted with congestive heart failure (CHF) consecutively. Patients who did not undergo LV catheterization or had renal dysfunction (serum creatinine >2.0 mg/dl) were excluded. A sample of 160 patients was obtained. For all participants, cardiac catheterization and echocardiograms were performed at a compensated CHF stage (before discharge), and plasma BNP was measured on the day before cardiac catheterization. The clinical characteristics of these patients are listed in Table 1.

BNP assay. Blood was collected into tubes containing EDTA, and plasma BNP was measured using a validated and commercially available immunoassay kit (Tosoh Co. Ltd., Japan).

Cardiac catheterization. Left ventricular pressure was recorded with a 5-F pigtail catheter connected to a fluid-filled transducer. Left ventricular volume and EF were determined with left ventriculography with contrast medium using Kennedy's formula.

Echocardiography. Echocardiographic examinations were performed with a Sonos 5500 machine equipped with a 2.5-MHz probe. M-mode images were obtained to measure left atrial and ventricular dimensions (14). The left ventricular mass index (LVMI) was estimated from the formula of Devereux et al. (15). The severity of mitral regurgitation was quantified on a semicontinuous scale from none (0) to moderately severe (3+). In patients with sinus rhythm, the pulsed Doppler transmitral flow velocity was recorded to measure a ratio of peak mitral E-wave velocity to peak mitral A-wave velocity (E/A ratio) and the deceleration time of the mitral E-wave velocity.

On the basis of hemodynamic and echocardiographic data, end-diastolic and systolic meridional wall stresses (WS) were calculated. These were obtained by using the formula: $WS = 0.334 \times P(LVID)/WT(1 + WT/LVID)$, where P = LV pressure (i.e., peak systolic pressure or EDP, which was obtained during cardiac catheterization), LVID = left ventricular internal dimension, and WT = wall thickness (16). In the present study, the posterior wall thickness was used to assess WT regardless of regional wall motion abnormalities. In the analysis of the interobserver reproducibility of the posterior wall thickness measurement in 48 patients with CHF, a high degree of the reproducibility was

Table 1. Patient Characteristics

	Total	SHF	DHF	p Value
n	160	98	62	
Women	31	25	40	0.052
Age, yrs	66.8 ± 1.0	66.3 ± 1.3	67.7 ± 1.6	0.485
BMI, kg/m ²	22.9 ± 0.3	22.8 ± 0.4	23.1 ± 0.4	0.684
NYHA functional class ≥2	32	37	24	0.138
HT	71	61	87	0.001
DM	35	36	34	0.946
HLP	53	49	58	0.338
AF	18	17	19	0.912
Etiology				
DCM	18	30	0	
ISCM or OMI	29	44	6	
HHD	26	9	53	
VHD	26	17	40	
Medications				
ACEI or ARB	70	77	57	0.013
Beta-blocker	51	54	46	0.397
Diuretics	60	71	42	0.001
BNP, pg/ml	282 ± 23	379 ± 33	129 ± 13	<0.001

Values are mean ± SEM or %.

ACEI = angiotensin-converting enzyme inhibitor; AF = atrial fibrillation; ARB = angiotensin receptor blocker; BMI = body mass index; DCM = dilated cardiomyopathy; DHF = diastolic heart failure; DM = diabetes mellitus; HHD = hypertensive heart disease; HLP = hyperlipidemia; HT = hypertension; ISCM = ischemic cardiomyopathy; NYHA = New York Heart Association; OMI = old myocardial infarction; SHF = systolic heart failure; VHD = valvular heart disease.

Table 2. Echocardiographic and Hemodynamic Parameters

	Total (n = 160)	SHF (n = 98)	DHF (n = 62)	p Value
FS, %	27 ± 1	20 ± 1	38 ± 1	<0.001
LVEDD, mm	57 ± 1	61 ± 1	50 ± 1	<0.001
LVMI, g/m ²	166 ± 4	179 ± 5	145 ± 6	<0.001
LAD, mm	45 ± 1	45 ± 1	44 ± 1	0.779
E/A	1.3 ± 0.1	1.5 ± 0.2	1.0 ± 0.1	0.024
EF, %	41.5 ± 1.1	32.0 ± 0.9	56.4 ± 0.5	<0.001
LVEDVI, ml/m ²	106 ± 4	125 ± 15	76 ± 2	<0.001
LVSP, mm Hg	134 ± 3	124 ± 3	151 ± 4	<0.001
LVEDP, mm Hg	14.9 ± 0.4	15.0 ± 0.6	14.8 ± 0.5	0.829

Values are mean ± SEM.

EF = ejection fraction; E/A = ratio of peak mitral E-wave velocity to peak mitral A-wave velocity; FS = fractional shortening; LAD = left atrial dimension; LVEDD = left ventricular end-diastolic dimension; LVEDP = left ventricular end-diastolic pressure; LVEDVI = left ventricular end-diastolic volume index; LVMI = left ventricular mass index; LVSP = left ventricular peak systolic pressure. Other abbreviations as in Table 1.

found with an intraclass correlation coefficient value 0.830 (95% confidence interval 0.609 to 0.925), and absolute difference was small (mean ± SD; 0.01 ± 1.16 mm). Also, adequate M-mode images were not available in three patients, and they were excluded in the present study.

Statistical analysis. Comparisons between groups were made using chi-square analysis for proportions and unpaired Student *t* tests for continuous variables. Linearity of a relationship between two variables was assessed by linear regression analysis; *p* < 0.05 was considered significant. Results were expressed as mean ± SEM.

RESULTS

Patient characteristics. Clinical characteristics of the group of 160 patients are summarized in Table 1. Mean age was 66.8 ± 1.0 years (range 20 to 87 years), and 31% of the patients were women. In all, 98 patients had HF symptoms with an LV EF of ≤50%. These comprised the systolic heart failure group (SHF). The diastolic heart failure group (DHF) was comprised of 62 patients with preserved systolic function (LV EF >50%). Mean age and body mass index did not differ significantly between SHF and DHF groups, while there was a trend of more female patients in DHF. A history of hypertension and etiologies of dilated cardiomyopathy and ischemic cardiomyopathy/old myocardial infarction were more prevalent in SHF. Patients with SHF were more likely to be taking angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers and diuretics.

Geometric and functional parameters obtained by echocardiography or cardiac catheterization are shown in Table 2. In total patients, mean EF was 41.5 ± 1.1% (range 13% to 66%), and mean LVMI and LV end-diastolic volume index (LVEDVI) were 166 ± 4 g/m² and 106 ± 4 ml/m², respectively.

Correlations of plasma BNP to echocardiographic and hemodynamic parameters. Scatter plots of plasma BNP levels (dependent variable) against some echocardiographic and hemodynamic parameters (independent) are shown in Figure 1. There were strong correlations between LV EF,

LVEDVI or LV end-systolic volume index, or LV EDP and plasma BNP (coefficient of correlation; *r*² = 0.325, 0.343, 0.421, and 0.328, respectively). There were weak correlations with parameters of transmitral Doppler flow *r*² = 0.201 and 0.101 for E/A and deceleration time, respectively. In contrast, LVMI and left atrial diameter did not show significant correlations with BNP levels. Although LV systolic wall stress (SWS) calculated by echocardiographic and hemodynamic parameters showed a modest correlation (*r*² = 0.277), a correlation of BNP with LV EDWS was much more robust (*r*² = 0.887).

Although age, gender, and atrial fibrillation were not significantly associated, body mass index (BMI) and New York Heart Association functional class ≥II were associated with BNP levels (*p* < 0.001 in both).

Comparison between SHF and DHF. Plasma BNP levels were significantly higher in SHF than in DHF (median [interquartile range]; 267 [136 to 583] and 105 [64 to 146] pg/ml, respectively, *p* < 0.001); however, EDP levels did not show any differences as shown in Figure 2 and Table 2. Other parameters such as SWS, EDWS, LV end-diastolic dimension, LVMI, LVEDVI, and LV peak systolic pressure were significantly higher in SHF than in DHF (*p* < 0.001). Scatter plots in patients with SHF and DHF are demonstrated in Figures 3A and 3B and Figures 3C and 3D, respectively. End-diastolic wall stress showed a better correlation with BNP (*r*² = 0.704) than EDP (*r*² = 0.143) in DHF as well as in SHF.

Subanalysis in patients without local wall motion abnormality. It is conceivable that this estimation of wall stress did not accurately reflect the entire non-uniform LV wall stress in patients with regional asynergy in LV wall motion or with variation in segmental LV wall thickness. In the present study, 83% of patients with ischemic cardiomyopathy or old myocardial infarction and 28% with dilated cardiomyopathy had regional wall motion abnormalities. Therefore, a subanalysis was performed for patients without local wall motion abnormality (*n* = 105). As a result, an even stronger correlation was obtained as shown (*r*² = 0.919). A correlation in patients with regional wall motion abnormality (*n* = 55) was still strong (*r*² = 0.820).

DISCUSSION

Heterogeneity of BNP levels among individuals with HF can cause some confusion in interpreting results. It has been unclear why some patients with LV EF <35% have BNP levels in the normal range whereas others exhibit extremely elevated levels, and why some patients with isolated diastolic dysfunction (i.e., with normal EF) show a similar increase of plasma BNP as do the patients with severe systolic dysfunction. One of the answers to the question has been the change of EDP levels in the LV (6). Another recent report has demonstrated that heterogeneity of BNP levels in patients with systolic HF reflects the severity of diastolic abnormality, right ventricular function, and mitral regurgi-

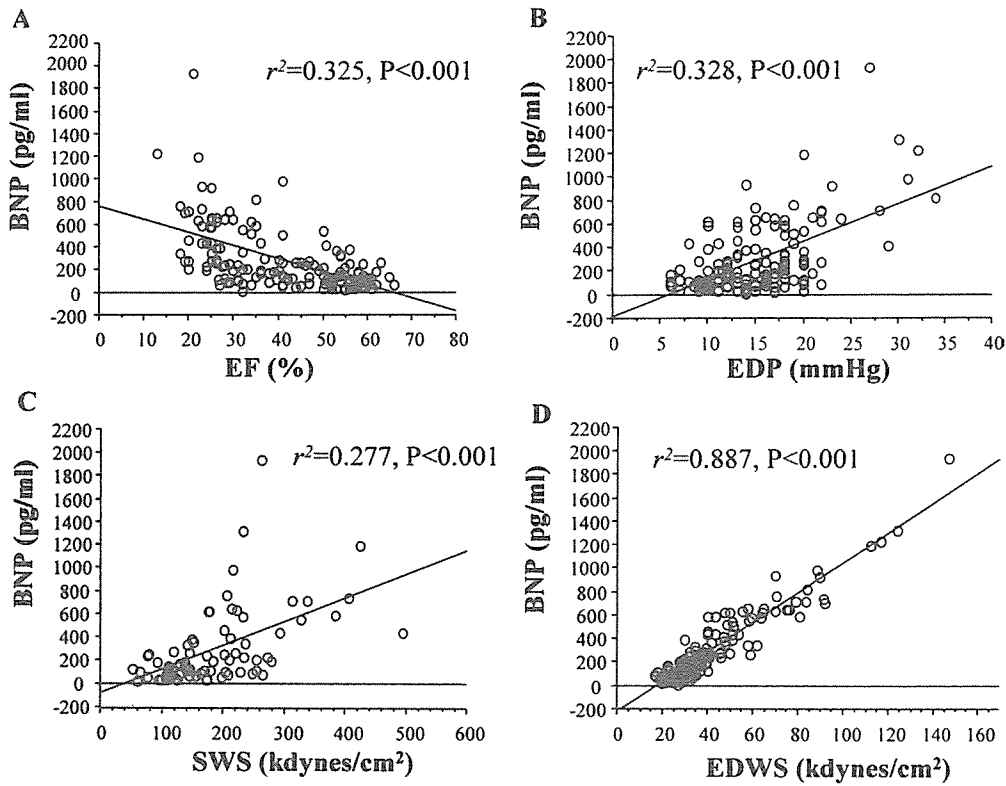


Figure 1. Correlation between B-type natriuretic peptide (BNP) and left ventricular functional parameters in all 160 patients. (A) Left ventricular ejection fraction (EF) (%). (B) End-diastolic pressure (EDP) (mm Hg). (C) End-systolic wall stress (SWS) (kdynes/cm²). (D) End-diastolic wall stress (EDWS) (kdynes/cm²).

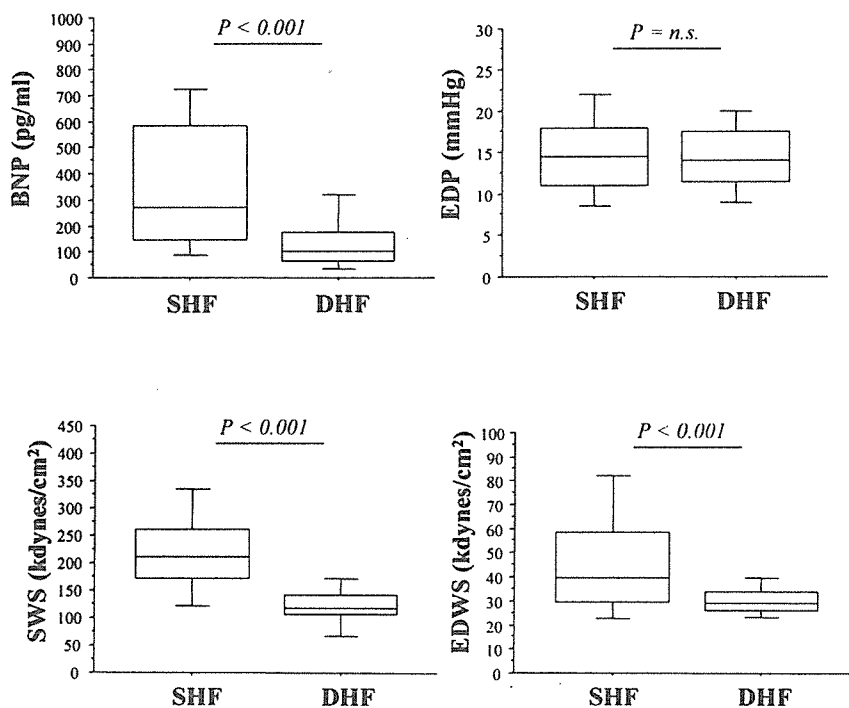


Figure 2. Differences of B-type natriuretic peptide (BNP) and left ventricular functional parameters between systolic heart failure (SHF) (n = 98) and diastolic heart failure (DHF) (n = 62). The box defines the interquartile range with the median indicated by the crossbar. The error bars indicate the 10th and 90th percentiles. EDP = end-diastolic pressure (mm Hg); EDVI = end-diastolic volume index (ml/m²); EDWS = end-diastolic wall stress (kdynes/cm²); SWS = end-systolic wall stress (kdynes/cm²).

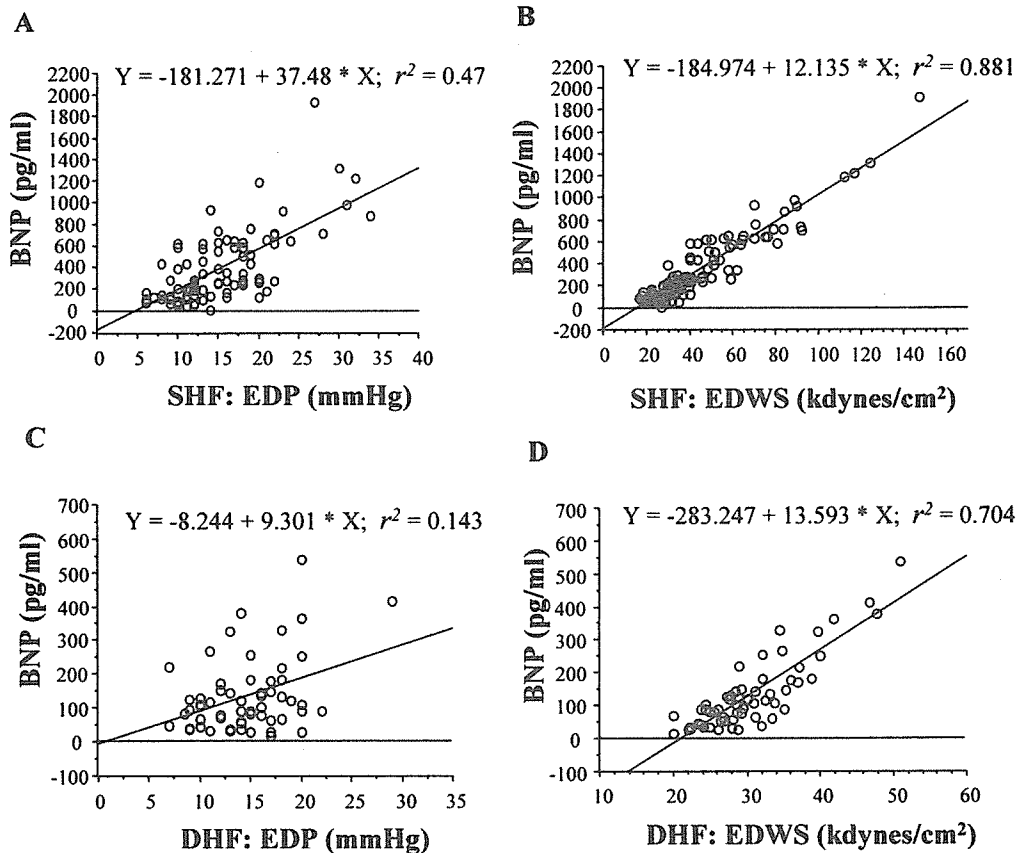


Figure 3. Correlation between B-type natriuretic peptide (BNP) and left ventricular functional parameters in 98 patients with systolic heart failure (SHF) (A and B) and in 62 patients with diastolic heart failure (DHF) (C and D); (A and C) end-diastolic pressure (EDP) (mm Hg) and (B and D) end-diastolic wall stress (EDWS) (kdynes/cm²).

tation in addition to LV EF, age, and renal function (7). The present study demonstrates the significance of LV EDWS in the regulation of BNP in patients with HF in general. This was true not only in patients with SHF but also with DHF. Although correlation analysis suggested a relationship between other parameters of LV geometry and function including EDP and plasma BNP levels, the correlation between LV EDWS and BNP was the most robust ($r^2 = 0.887$). Many studies including ours have shown that BNP levels correlate well with changes in filling pressures during tailored therapy (6,17), while O'Neill et al. (18) recently reported that plasma BNP might not correlate closely with changes in intracardiac filling pressures. In any case, plasma BNP levels are not uniform across different patients with the same LVEDP (i.e., interindividual heterogeneity), and this may be because BNP is determined more by EDWS than by filling pressure. Left ventricular EDWS might account for the wide variations that they observed in patients with HF.

The present result suggests that LV EDWS may regulate BNP secretion in humans. Indeed, experiments using cultured neonatal rat ventricular cells showed that cardiac myocytes are able to respond to mechanical stretch by increasing BNP secretion and gene expression (11). Wiese et al. (19), using isolated human myocardium, have also

demonstrated that, while the isometric contraction mode did not have any influence on BNP expression, diastolic overstretch increased BNP gene expression in a time-dependent manner. This implies that diastolic stretch (i.e., preload rather than afterload) seems to be the mechanical factor responsible for the induction of BNP expression and may be the reason that in the present study LV EDWS shows a better correlation with the plasma BNP levels than does LV SWS. Furthermore, *in vitro* studies have implicated the contributions of local paracrine and autocrine factors in the stretch-induced BNP activation (11). Local angiotensin II was shown to play a critical role in the development of stretch-induced cardiac hypertrophy and to at least partly regulate mechanical load-induced BNP expression. Recently, in addition to stimuli such as myocyte stretching and neurohumoral activation, acute myocardial hypoxia has been reported to increase cardiac BNP gene transcription and raise the plasma proBNP concentration in an animal study (20). This mechanism may explain the increase in plasma BNP in patients with acute coronary syndromes and myocardial infarction (21). In the present study, because such patients with acute ischemia were not included, the correlation between LV EDWS and plasma BNP might actually be stronger.

Myocardial wall stress is one of the primary determinants of myocardial oxygen consumption (22). Cardiac decompensation is thought to result when the feedback loop that normalizes wall stress to abnormal loading of the heart dysfunctions. The increased wall stress may act directly or indirectly via cellular mediators such as angiotensin, endothelin, inflammatory cytokines, reactive oxygen species, and matrix metalloproteinase to orchestrate a variety of molecular and cellular remodeling events determining the structural and functional properties of the myocardium and, ultimately, the rate of disease progression (23-27). Therefore, usefulness of plasma BNP levels in predicting morbidity and mortality accurately in patients with chronic HF may be explained by the relationship between the LV EDWS and BNP. Many other factors, such as age, gender, body mass, genetics, etc., are also known to affect plasma BNP levels. However, the demonstration of the link between the hemodynamics (LV EDWS) and neurohormonal factor (BNP) may support the usefulness of BNP-guided treatment of HF. Although more randomized studies are needed, pharmacotherapy guided by BNP levels is intriguing and promising (3).

There are several methods to estimate the wall stress, and we used a formula based on M-mode echocardiographic variables (16). This method may have several limitations. For example, when there is regional asynergy in LV wall motion and variation in local LV wall thickness, the estimate may not reflect the entire non-uniform LV wall stress correctly. To test this possibility, we analyzed the data of the patients without LV asynergy demonstrated by echocardiogram and LV ventriculography. We obtained an even better correlation. Interestingly, a correlation in patients with a local wall motion abnormality was still strong ($r^2 = 0.820$). There are several other limitations to our study. Echocardiography and blood sampling were typically performed the day before cardiac catheterization. This time lag could have influenced the results. A further limitation is that the study population was composed of the patients who were in stable condition and could tolerate LV cardiac catheterization; thus, patients who could not bear cardiac catheterization (e.g., patients with New York Heart Association functional class IV HF) were excluded.

In the present study, we demonstrated that plasma BNP levels strongly reflect EDWS in the LV more than any other parameter previously reported. In addition, EDWS accurately accounts for the increase in plasma BNP levels even in patients with diastolic HF. The relationship of LV EDWS to plasma BNP may give a better understanding to the interindividual heterogeneity of plasma BNP levels and its clinical utility in the diagnosis and management of HF.

Reprint requests and correspondence: Dr. Yoshitaka Iwanaga, Department of Cardiovascular Medicine, Kyoto University Graduate School of Medicine, 54 Shogoinn-kawaharacho, Kyoto 606-8507, Japan. E-mail: yiwanaga@kuhp.kyoto-u.ac.jp.

REFERENCES

1. Maisel AS, Krishnaswamy P, Nowak RM, et al. Rapid measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure. *N Engl J Med* 2002;347:161-7.
2. Anand IS, Fisher LD, Chiang YT, et al. Changes in brain natriuretic peptide and norepinephrine over time and mortality and morbidity in the Valsartan Heart Failure Trial (Val-HeFT). *Circulation* 2003;107:1278-83.
3. Troughton RW, Frampton CM, Yandle TG, Espiner EA, Nicholls MG, Richards AM. Treatment of heart failure guided by plasma aminoterminal brain natriuretic peptide (N-BNP) concentrations. *Lancet* 2000;355:1126-30.
4. Lubien E, DeMaria A, Krishnaswamy P, et al. Utility of B-natriuretic peptide in detecting diastolic dysfunction: comparison with Doppler velocity recordings. *Circulation* 2002;105:595-601.
5. Tang WH, Girod JP, Lee MJ, et al. Plasma B-type natriuretic peptide levels in ambulatory patients with established chronic symptomatic systolic heart failure. *Circulation* 2003;108:2964-6.
6. Maeda K, Tsutamoto T, Wada A, Hisanaga T, Kinoshita M. Plasma brain natriuretic peptide as a biochemical marker of high left ventricular end-diastolic pressure in patients with symptomatic left ventricular dysfunction. *Am Heart J* 1998;135:825-32.
7. Troughton RW, Prior DL, Pereira JJ, et al. Plasma B-type natriuretic peptide levels in systolic heart failure: importance of left ventricular diastolic function and right ventricular systolic function. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:416-22.
8. Yamamoto K, Burnett JC Jr., Jougasaki M, et al. Superiority of brain natriuretic peptide as a hormonal marker of ventricular systolic and diastolic dysfunction and ventricular hypertrophy. *Hypertension* 1996;28:988-94.
9. Yasue H, Yoshimura M, Sumida H, et al. Localization and mechanism of secretion of B-type natriuretic peptide in comparison with those of A-type natriuretic peptide in normal subjects and patients with heart failure. *Circulation* 1994;90:195-203.
10. Liang F, Gardner DG. Mechanical strain activates BNP gene transcription through a p38/NF-kappaB-dependent mechanism. *J Clin Invest* 1999;104:1603-12.
11. Tokola H, Hautala N, Marttila M, et al. Mechanical load-induced alterations in B-type natriuretic peptide gene expression. *Can J Physiol Pharmacol* 2001;79:646-53.
12. Ikeda T, Matsuda K, Itoh H, et al. Plasma levels of brain and atrial natriuretic peptides elevate in proportion to left ventricular end-systolic wall stress in patients with aortic stenosis. *Am Heart J* 1997;133:307-14.
13. Vanderheyden M, Goethals M, Verstreken S, et al. Wall stress modulates brain natriuretic peptide production in pressure overload cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:2349-54.
14. Schiller NB, Shah PM, Crawford M, et al. Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 1989;2:358-67.
15. Irvine T, Li XK, Sahn DJ, Kenny A. Assessment of mitral regurgitation. *Heart* 2002;88 Suppl 4:IV11-9.
16. Douglas PS, Reichek N, Plappert T, Muhammad A, St John Sutton MG. Comparison of echocardiographic methods for assessment of left ventricular shortening and wall stress. *J Am Coll Cardiol* 1987;9:945-51.
17. Kazanegra R, Cheng V, Garcia A, et al. A rapid test for B-type natriuretic peptide correlates with falling wedge pressures in patients treated for decompensated heart failure: a pilot study. *J Card Fail* 2001;7:21-9.
18. O'Neill JO, Bott-Silverman CE, McRae AT 3rd, et al. B-type natriuretic peptide levels are not a surrogate marker for invasive hemodynamics during management of patients with severe heart failure. *Am Heart J* 2005;149:363-9.
19. Wiese S, Breyer T, Dragu A, et al. Gene expression of brain natriuretic peptide in isolated atrial and ventricular human myocardium: influence of angiotensin II and diastolic fiber length. *Circulation* 2000;102:3074-9.
20. Goetze JP, Gore A, Moller CH, Steinbruechel DA, Rehfeld JF,

- Nielsen LB. Acute myocardial hypoxia increases BNP gene expression. *FASEB J* 2004;18:1928-30.
21. de Lemos JA, Morrow DA, Bentley JH, et al. The prognostic value of B-type natriuretic peptide in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2001;345:1014-21.
 22. Yin FC. Ventricular wall stress. *Circ Res* 1981;49:829-42.
 23. Colucci WS. Molecular and cellular mechanisms of myocardial failure. *Am J Cardiol* 1997;80:15L-25L.
 24. Iwanaga Y, Kihara Y, Inagaki K, et al. Differential effects of angiotensin II versus endothelin-1 inhibitions in hypertrophic left ventricular myocardium during transition to heart failure. *Circulation* 2001;104:606-12.
 25. Di Napoli P, Taccardi AA, Grilli A, et al. Left ventricular wall stress as a direct correlate of cardiomyocyte apoptosis in patients with severe dilated cardiomyopathy. *Am Heart J* 2003;146:1105-11.
 26. Wollert KC, Heineke J, Westermann, et al. The cardiac Fas (APO-1/CD95) receptor/Fas ligand system: relation to diastolic wall stress in volume-overload hypertrophy in vivo and activation of the transcription factor AP-1 in cardiac myocytes. *Circulation* 2000;101:1172-8.
 27. Iwanaga Y, Aoyama T, Kihara Y, Onozawa Y, Yoneda T, Sasayama S. Excessive activation of matrix metalloproteinases coincides with left ventricular remodeling during transition from hypertrophy to heart failure in hypertensive rats. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:1384-91.

β_2 -Adrenoceptor Polymorphisms Relate to Obesity Through Blunted Leptin-Mediated Sympathetic Activation

Kazuko Masuo, Tomohiro Katsuya, Hideki Kawaguchi,
Yuxiao Fu, Hiromi Rakugi, Toshio Ogihara, and Michael L. Tuck

Background: Obesity is a growing public health problem. It has been reported that β_2 -adrenoceptor polymorphisms are associated with obesity. This study examines the associations of β_2 -adrenoceptor polymorphism with relationships between plasma norepinephrine (NE) and leptin to evaluate further the mechanisms of obesity.

Methods: In 329 normotensive (BP <140/90 mm Hg) men with a wide range of BMI (17.0 to 36.5 kg/m²), we measured BMI, total body fat mass, waist-to-hip ratio (W/H), BP, plasma NE, leptin, and the β_2 -(Arg16Gly, Gln27Glu) adrenoceptor polymorphisms. The subjects consisted of 206 nonobese (BMI <25 kg/m²) and 123 overweight or obese (BMI \geq 25 kg/m²) men.

Results: Overweight or obese subjects had a significantly higher frequency of Gly16 and Glu27 alleles compared with nonobese subjects. The subjects carrying Gly16 or Glu27 alleles regardless of BMI had greater total fat mass, W/H and plasma leptin compared with those without the Gly16 or Glu27 alleles, indicating that Gly16 and Glu27 alleles of the β_2 -adrenoceptor gene are related to obesity and fat mass. Only in the nonobese subjects who

carried the Gly16 and Glu27 alleles was there a high plasma NE level, but similar in overweight or obese subjects. To evaluate leptin-mediated sympathetic activation, we performed linear regression analyses between plasma leptin and NE. In groups with and without the Gly16 or Glu27 alleles, plasma leptin correlated with NE, but the slope in the group carrying the Gly16 or Glu27 allele was significantly lower than that without the Gly16 or Glu27.

Conclusions: The findings demonstrate a strong and significant association of the Gly16 and Glu27 alleles with obesity. Lower slopes between leptin and NE in the subjects carrying these β_2 -adrenoceptor polymorphisms indirectly indicate a blunted leptin-mediated sympathetic nerve activity. We propose that the β_2 -adrenoceptor polymorphisms related to blunted leptin-mediated sympathetic activation offers further proof for the mechanisms of obesity. Am J Hypertens 2006;19:1084–1091 © 2006 American Journal of Hypertension, Ltd.

Key Words: β -Adrenoceptor polymorphisms, obesity, leptin, sympathetic nerve activity.

Obesity and obesity-related cardiovascular diseases are growing public health problems.¹ Many clinical and epidemiologic observations show that obesity and hypertension are associated with heightened sympathetic nerve activity.^{2–8} Reduced energy expenditure and resting metabolic rate are predictive of weight gain. The sympathetic nervous system participates in regulating energy balance through thermogenesis, however, paradoxically heightened sympathetic nerve activity is observed in obese human beings. In addition, the plasma concentrations of the adipocyte hormone, leptin, is ele-

vated in human obesity.^{9,10} Leptin has been shown to influence sympathetic nerve activity.^{11–13} Taken together, there might be a role for leptin in sympathetic nerve stimulation and the resultant development of obesity accompanied by heightened sympathetic nerve activity.

There is evidence that human obesity has strong genetic as well as environmental determinants.^{14,15} We have also reported that heightened sympathetic nerve activity determined by genetic backgrounds predicts subsequent weight gain and blood pressure (BP) elevations in previously nonobese subjects.^{15,16} The thermogenesis effects in obesity

Received November 2, 2005. First decision January 29, 2006. Accepted February 12, 2006.

From the Human Neurotransmitter Laboratory (KM), Baker Heart Research Institute, Melbourne, Victoria, Australia; Department of Geriatric Medicine (TK, HK, YF, HR, TO), Osaka University Graduate School of Medicine, Suita City, Osaka, Japan; and Metabolism and

Endocrinology Division (MLT), Sepulveda VA Medical Center and David Geffen UCLA School of Medicine, Los Angeles, California, USA.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Kazuko Masuo, Baker Heart Research Institute, PO Box 6492 St. Kilda Road Central, Melbourne, Victoria 8008, Australia; e-mail: kmasuo@baker.edu.au

and in weight gain have been mainly attributed to the activity of the β_2 -adrenergic receptor in human beings.^{16,17} However, the precise relationships of the polymorphisms of sympathetic nerve activity as well as the leptin-sympathetic nerve activity axis were not fully clarified. Thus, the present study examines the relationships between leptin, sympathetic nerve activity (plasma NE levels) and obesity in normotensive subjects carrying the alleles of the β_2 -adrenoceptors polymorphisms which predict obesity as previously reported.¹⁶

Methods

Subjects

Subjects were recruited from a cohort of 1121 men who work in a single company in Osaka, Japan, as part of their annual medical evaluation. Subjects at study entry were excluded who were >50 years of age, had hypertension (BP \geq 140/90 mm Hg), and had diabetes mellitus (fasting glucose level >100 mg/dL). Additional exclusions were subjects who were taking medications for hypertension, hyperlipidemia, hyperuricemia (metabolic syndrome)¹⁸ or other illness, and who had any symptoms of obstructive sleep apnea.¹⁹ The goal of this study was to evaluate the mechanisms of obesity with leptin, sympathetic nerve activity as quantitated by plasma NE levels, and the genotypes for the β_2 -adrenoceptor gene. Thus, only normotensive subjects who had steady body weight and BP levels (weight and mean BP levels had not changed significantly (<10%) over the past year before the entry period) were enrolled in this study to minimize the influence of hypertension, weight change (\geq 10%) or BP changes on sympathetic nerve activity or leptin levels.^{4-6,16} After exclusion, 329 young, nondiabetic, normotensive (BP <140/90 mm Hg) men with a wide range of BMI (17.0 to 36.5 kg/m²) on no medications were enrolled in the present study. There were 206 nonobese normotensive men (BMI <25.0 kg/m²) and 123 overweight or obese normotensive men (BMI \geq 25.0 kg/m²).²⁰ Informed consent was obtained from each subject, as approved by the Ethics Committee of Osaka University Graduate School of Medicine, Japan.

Measurements

After an overnight fast of >12 h, BMI, total body fat mass, ratio of waist to hip circumference (waist-to-hip ratio), BP, heart rate, and venous sampling for plasma norepinephrine (NE), leptin levels, and extraction of genomic DNA from leukocytes were taken after a 30-min rest period in the supine position in a quiet room.

Both BP and heart rate were measured at each review three times in the supine position by an automated sphygmomanometer (TM-2713, A&D Company, Ltd., Tokyo, Japan) using an adjusted cuff size that had been standardized against a mercury sphygmomanometer, and were averaged. Those subjects who had a wide variability in BP and heart rate were asked to return for repeated measurements on three separate visits to exclude chance variation.

The percentage body fat mass was determined with impedance measurements (BF-102, Tanita Co., Tokyo, Japan), and total body fat mass (kg) was calculated according to the following formula: [percentage body fat mass (%) / 100] \times body weight (kg).

Laboratory Determinations

Plasma NE was measured by high-performance liquid chromatography with a fluorometric method and plasma leptin was measured by radioimmunoassay (human leptin RIA kit, Linco, St Charles, MO) as previously described for this laboratory.⁵

Genotyping

Genotyping was performed by the TaqMan assay as previously described (Applied Biosystems, Foster City, CA).²¹ Two polymorphisms in the β_2 -adrenergic receptors (arginine/glycine substitution, Arg16Gly; and glutamine/glutamate substitution, Gln27Glu) of the β_2 -adrenoceptor gene were studied.^{16,17} The probes and primers used in the TaqMan assay were as follows. For single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the β_2 -adrenergic receptor gene, the probes and primers were as follows: for Arg16Gly, the probes were CGCATGGCTTCCATTGGGTGC and CGCATGGCTTCTATTGGGTGC, and the primers were GGAACGGCAGCGCCTTCT and CAGGACGATGAGAGACATGACGAT; and, for Gln27Glu, the probes were CTCGTCCTTTCCTGCGTGACGT and CTCGTCCTTTCCTGCGTGACGT (the primers used in this assay were the same as those used for Arg16Gly).

Statistical Analysis

Values are shown as mean \pm SD. Genotype frequencies and the Hardy-Weinberg equilibrium were estimated with χ^2 test. All data analyses were performed with SPSS 8.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL). Differences among groups were examined by the unpaired *t* test. Multiple regression linear analyses were applied to evaluate the relationship between mean BP as a dependent variable and BMI, total body fat mass, waist-to-hip ratio, age, plasma NE, and leptin levels as independent variables. Analysis of covariance was applied to evaluate the interactions between plasma NE as a dependent variable and leptin as an independent variable in alleles of β_2 -adrenoceptor polymorphisms to compare the relationships between those parameters. Values of *P* < .05 were considered significant.

Results

Characteristics of Nonobese and Obese Groups

Overweight or obesity were defined as BMI \geq 25 kg/m² for our Japanese study population.²⁰ The overweight or obese group had significantly greater BMI, total body fat

Table 1. Characteristics of subjects according to body mass index

Variable	Nonobese subjects (BMI < 25 kg/m ²)	Overweight or obese subjects (BMI ≥ 25 kg/m ²)
Subjects (n)	206	123
Age (y)	37 ± 6	37 ± 8
BMI (kg/m ²)	22.6 ± 1.8	27.9 ± 2.4†
Total body fat mass (kg)	12.5 ± 2.1	24.4 ± 4.4†
Waist-to-hip ratio	0.88 ± 0.09	1.11 ± 0.09*
Systolic BP (mm Hg)	126 ± 6	132 ± 7*
Diastolic BP (mm Hg)	74 ± 5	81 ± 8*
Mean BP (mm Hg)	93 ± 5	98 ± 7*
Heart rates (beats/min)	67 ± 6	74 ± 7*
Norepinephrine (pmol/mL)	1.20 ± 0.46	2.01 ± 0.68†
Leptin (ng/mL)	4.8 ± 2.4	5.8 ± 2.3*

BMI = body mass index; BP = blood pressure.

Data are mean ± SD.

* $P < .05$; † $P < .01$ v values in nonobese subjects.

mass, waist-to-hip ratio, systolic, diastolic and mean BP, heart rate, plasma NE, and leptin levels compared with the nonobese group (Table 1).

Comparisons of Frequencies of Genotypes and Alleles of the β_2 -Adrenoceptor Polymorphisms Between Nonobese and Obese Groups

Overweight or obese subjects had higher frequencies of the homozygous genotype Gly16, the Gly16 allele of Arg16Gly, and the Glu27 allele of Gln27Glu compared with nonobese subjects (Table 2). The allele frequency of Glu27 of the β_2 -adrenoceptor polymorphism in all subjects was 5.0%, but all studied loci allele and genotype frequencies were in accordance with the Hardy-Weinberg equilibrium. The distribution of Glu27 was similar to those in previous studies in Japanese cohorts, but much lower than studies in Caucasian subjects.^{17,22}

Relative risk of the Gly16 and Glu27 allele for overweight or obesity were 1.34 and 1.49, respectively.

Comparisons of Characteristics Between Subjects With and Without Gly16 or Glu27 Alleles of the β_2 -Adrenoceptor Polymorphisms

Frequencies of the Gly16 and Glu27 alleles were significantly higher in the overweight or obese group compared with those in the nonobese group, indicating that these alleles are associated with obesity. Thus, we compared the measurements between subjects with and without the Gly16 allele (Table 3) or Glu27 allele (Table 4). Total body fat mass, waist-to-hip ratio and plasma leptin levels, but not BMI, were significantly greater in subjects carrying the Gly16 and Glu27 allele regardless of BMI compared with the subjects without the Gly16 or Glu27 allele. Plasma NE levels were higher in subjects carrying Gly16 or Glu27 allele only in the nonobese group, but those were similar between the obese groups with and without the

Gly16 or Glu27 allele (Tables 3 and 4). In all subjects, total body mass, waist-to-hip ratio and plasma leptin levels were greater in subjects carrying the Gly16 or Glu27 allele compared with those without those allele, but BMI and plasma NE were similar (Tables 3 and 4).

Relationships Between Plasma Leptin and Norepinephrine Levels

In all subjects, plasma leptin levels ($P = .011$) as well as total body fat mass ($P = .024$) and mean BP ($P < .001$) were significant determinant variables for plasma NE levels using multiple linear regression analysis ($R^2 = 0.148$, $R = 10.35$, $P < .001$), demonstrating that plasma NE levels is strongly related with plasma leptin levels. Thus, we compared the linear regression in plasma leptin and NE levels between subjects with and without the Gly16 or Glu27 allele to evaluate the relationships between genotypes and the leptin-sympathetic nerve (NE) axis. Both groups with and without the Gly16 allele of Arg16Gly had significant correlations between plasma leptin and NE levels (subjects with Gly16 allele, $R = 0.27$; $R = 8.23$; $P = .005$; coefficient = 0.047; plasma NE = 1.20 + 0.048x plasma leptin, subjects without Gly16 allele, $R = 0.39$; $R = 15.36$; $P < .001$; coefficient = 0.119; plasma NE = 1.04 + 0.120x plasma leptin), but the analysis of covariance revealed that the slope in the group carrying the Gly16 was significantly lower ($P < .01$) (Fig. 1). Similar correlations between plasma leptin and NE levels were shown in both groups with and without the Glu27 allele (subjects with Glu27 allele, $R = 0.28$; $R = 3.10$; $P = .047$; coefficient = 0.038; plasma NE = 1.45 + 0.038 × plasma leptin, subjects without Glu27 allele, $R = 0.33$; $R = 17.60$; $P < .001$; plasma NE = 1.03 + 0.100 × plasma leptin, coefficient = 0.100). The slope in the group carrying Glu27 allele was significantly lower ($P < .01$) (Fig. 2).